

## 試験研究成果普及情報

| 部門                                                                                                                                                        | 病害虫                                                                        | 対象 | 普及 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|
| 課題名：トルコギキョウ斑点病菌の遺伝子診断技術                                                                                                                                   |                                                                            |    |    |
| 〔要約〕PCR 法及び LAMP 法によって、植物体や環境中からトルコギキョウ斑点病菌を迅速に検出できる手法を開発した。斑点病の初期症状である黄斑葉については、外観から生理障害などによる類似症状との判別は困難であるが、本手法を用いることで、組織分離を行った場合とほぼ同等の精度で診断を行うことが可能である。 |                                                                            |    |    |
| フリーキーワード トルコギキョウ、斑点病、PCR、LAMP、診断                                                                                                                          |                                                                            |    |    |
| 実施機関名                                                                                                                                                     | 主 査 農林総合研究センター 生物工学研究室<br>協力機関 農林総合研究センター 暖地園芸研究所 生産環境研究室、<br>三重大学、安房農業事務所 |    |    |
| 実施期間                                                                                                                                                      | 2021年度～2023年度                                                              |    |    |

### 〔目的及び背景〕

トルコギキョウ斑点病は、葉にすす状病斑を形成し、トルコギキョウの商品価値を低下させる病害である。本病は、こうした典型的なすす状病斑を形成するまでの期間が長いため、感染初期に適切な診断に基づいた防除を行うことが重要である。本病の診断は、罹病組織から斑点病菌を分離することで行われるが、本菌は生育が遅い上に培地上では分生子を形成しないため、判定するまでに日数を要し、熟練した担当者であっても診断が難しい。また、すす状病斑が形成される前に初期症状として黄斑症状を呈することが報告されているが、黄斑症状の診断に関する詳細な知見は無く、防除が遅れる要因となっている。そこで、発病の初期段階の罹病葉等から、本菌を検出できる遺伝子診断技術を開発する。

### 〔成果内容〕

- 1 本菌の *rpb2* 領域の特異的な塩基配列に基づいて LAMP プライマーと PCR プライマーを設計した。LAMP 法と PCR 法の検出精度を比較すると、検出感度は両手法とも同程度の 10 pg であり、検出特異性については、LAMP 法は近縁種 4 種中 2 種から本菌を識別でき、PCR 法では近縁種 4 種全てから識別することができる（表 1）。LAMP 法は専用の実験機器を必要とせず、一定の温度で反応が可能であることから簡易的な診断法として活用可能である。PCR 法は専用の実験機器を必要とするが、検出特異性が高いことから正確な診断が可能である。従来の組織分離による方法では、7～14 日程度の診断期間が必要であったが、本手法を活用することで 1 日程度の短期間で正確な診断ができる。
- 2 LAMP 法による遺伝子診断は、温湯中で 30 分程度反応させることで実験室外においても、実験室内の条件下と同等の精度で診断ができる（図 1、表 2）。この LAMP 法に

よる簡易診断を活用することで、現地発病圃場において即座に診断を行うことも可能である。

- 3 本病の初期症状と考えられている葉の黄斑症状から検出を行った場合、150 枚中 11 枚のサンプルで本菌が分離された。遺伝子診断では、本菌が分離された 11 枚中 8 枚（LAMP 法）又は 11 枚中 10 枚（PCR 法）のサンプルで陽性が確認された（表 3）。黄斑症状は、本病の初期症状と考えられていたが、生理障害などの他の要因によって発生している場合があり、これらを目視だけで判別することは困難である（図 2）。
- 4 開発した遺伝子診断技術を応用し、栽培環境から本菌を検出する手法を開発した。栽培資材を洗浄した液（分生子懸濁液）を 0.8  $\mu$ m 目合フィルターで吸引ろ過し、フィルターを培地上に置床して生育してきた菌叢を PCR 法で検定することで、本菌を検出することができる。1 spore/ml の濃度の分生子懸濁液 100 ml 程度を採取することができれば、検出が可能である（データ省略）。本手法を用いることで、栽培施設の壁面やかん水による飛沫等から、本菌を検出でき、汚染状況を調査することができる（表 4）。

[留意事項]

[普及対象地域]

県内全域

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 PCR 法及び LAMP 法の検出感度と特異性

| 種名              | 菌株                                               | 宿主      | DNA量                                                | PCR <sup>1</sup> | LAMP <sup>2, 3</sup> |
|-----------------|--------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------|------------------|----------------------|
| トルコギキョウ<br>斑点病菌 | <i>Pseudocercospora nepheloides</i><br>CH20PN1-1 | トルコギキョウ | 1 ng                                                | +                | +                    |
|                 |                                                  |         | 100 pg                                              | +                | +                    |
|                 |                                                  |         | 10 pg                                               | +                | +                    |
|                 |                                                  |         | 1 pg                                                | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | 100 fg                                              | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | 10 fg                                               | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | 1 fg                                                | -                | -                    |
| 斑点病菌近縁種         | CH20PN2-2                                        | トルコギキョウ | 1 ng                                                | +                | +                    |
|                 |                                                  |         | <i>Pseudocercospora fukuokaensis</i><br>MAFF237768  | -                | +                    |
|                 |                                                  |         | <i>Pseudocercospora stephanandrae</i><br>MAFF237799 | -                | +                    |
|                 |                                                  |         | <i>Pseudocercospora kaki</i><br>MAFF238214          | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | <i>Pseudocercospora fuligena</i><br>MAFF238222      | -                | -                    |
| トルコギキョウ<br>他病害  | MAFF712188                                       | トルコギキョウ | <i>Fusarium oxysporum</i><br>1 ng                   | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | <i>Botrytis cinerea</i><br>1 ng                     | -                | -                    |
|                 |                                                  |         | <i>Colletotrichum fioriniae</i><br>MAFF306247       | -                | -                    |

注 1) PCR 法は TaKaRa Taq HS (タカラバイオ (株)) を用いて行った。反応条件は、94℃ 2 分、(94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 15 秒) × 40 サイクル、72℃ 8 分とし、PCR 産物を電気泳動し、標的のサイズ (約 170 bp) のバンドが確認されたものを陽性と判定した

注 2) LAMP 法は Bst DNA Polymerase 試薬 ((株) ニッポンジーン) を用いて 68℃ 1 時間で反応を行った。60 分以内に濁度 0.1 以上になったものを陽性と判定した

注 3) LAMP 法において、識別できなかった近縁種 2 種はエゴノキ、コゴメウツギから分離された菌株であり、現地圃場内に存在する可能性は低いため、実用上は問題ないと考えられた

1. 水道水で 10 秒ほど  
採取葉を洗う。



2. 黄斑部を切り出し 0.5～  
1 cm 角に 3、4 等分する。



3. 100 μl の滅菌水を入れた  
1.5 ml チューブに葉片を  
入れよく振る。



4. LAMP 反応液に 3 の上清 5  
μl を入れる。同様に、ポ  
ジコン、ネガコンをそれ  
ぞれ 5 μl ずつ入れる。



5. 反応液をジップロックに  
まとめて入れ、お湯  
(68℃ 最適、60～70℃ で  
反応) に入れる。



6. 30 分間お湯で反応した後、  
チューブを取り出す。  
陽性の場合には黄色、陰性  
の場合には赤色を呈する。



図 1 LAMP 法による簡易診断の流れ

表 2 LAMP 法による簡易診断に用いた黄斑葉の診断結果

| サンプル    | 現地を想定した手法 |   | 実験室内での手法 |   |
|---------|-----------|---|----------|---|
| 黄斑葉     | 1         | + |          | + |
|         | 2         | - |          | - |
|         | 3         | + |          | + |
|         | 4         | + |          | + |
| 斑点病菌DNA |           | + |          | + |
| 滅菌水     |           | - |          | - |

注) 現地を想定した手法：60～70℃に調製した温湯中での反応  
実験室内での手法：60℃設定のウォーターバス中での反応

表 3 現地圃場から採取した黄斑葉の各検出手法による陽性数

| 採取時期    | 供試葉数 <sup>1</sup> | 感染葉 <sup>2</sup> |                    |                    |                   | 非感染葉 <sup>3</sup> |                    |                    |                   |
|---------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|         |                   | 感染葉数             | 検出葉数/感染葉数          |                    |                   | 非感染葉数             | 検出葉数/非感染葉数         |                    |                   |
|         |                   |                  | 顕微鏡観察 <sup>4</sup> | LAMP法 <sup>5</sup> | PCR法 <sup>6</sup> |                   | 顕微鏡観察 <sup>4</sup> | LAMP法 <sup>5</sup> | PCR法 <sup>6</sup> |
| R3年度普通作 | 63                | 10               | 6/10               | 7/10               | 9/10              | 53                | 0/53               | 0/53               | 0/53              |
| R3年度抑制作 | 44                | 1                | 1/1                | 1/1                | 1/1               | 43                | 0/43               | 0/43               | 0/43              |
| R4年度普通作 | 43                | 0                | -                  | -                  | -                 | 43                | 0/43               | 0/43               | 0/43              |
| 計       | 150               | 11               | 7/11               | 8/11               | 10/11             | 139               | 0/139              | 0/139              | 0/139             |

- 注 1) 現地生産圃場もしくは暖地園芸研究所の接種圃場から感染ごく初期の病徴と思われる黄斑症状を示す葉を採取し、黄斑症状部分を切り取り各検出手法に用いた
- 注 2) WA 培地を用いた常法による組織分離を行い、*Pseudocercospora* 属菌と推定される菌叢が形成されたサンプルを感染葉とした
- 注 3) WA 培地を用いた常法による組織分離を行い、*Pseudocercospora* 属菌と推定される菌叢が形成されなかったサンプルを非感染葉とした。黄斑症状を示していたが本菌が分離されなかったので生理障害によるものと考えられた
- 注 4) 顕微鏡観察は、葉片の黄斑箇所を光学顕微鏡で観察し分生子塊の形成が確認されたサンプルを陽性とした
- 注 5) LAMP 法は、葉片を滅菌水中に入れ、その上清を LAMP 反応に用いた。表 1 と同様の手法で行い、60 分以内に濁度 0.1 以上になったものを陽性と判定した
- 注 6) PCR 法は、R3 年度サンプルは MagExtractor™ -Plant Genome- (東洋紡 (株)) によって、R4 年度サンプルはシカジーニース DNA 抽出試薬 (関東化学 (株)) によって抽出した DNA を用いた。表 1 と同様の手法で PCR 反応を行い、PCR 産物を電気泳動し、標的のサイズのバンドが確認されたものを陽性と判定した



図 2 発病圃場から採取した黄斑葉

表 4 発病圃場から採取した洗浄液及びかん水飛沫液からの検出

| 供試サンプル              |          | 陽性箇所/検査箇所 |
|---------------------|----------|-----------|
| 栽培圃場 <sup>1</sup>   | ガラス温室壁面  | 2/4       |
|                     | パイプハウス壁面 | 3/6       |
| かん水飛沫液 <sup>2</sup> |          | 4/7       |

注 1) 栽培圃場壁面の調査は、壁面に吹きかけた滅菌水を水切ワイパーで 40 ml 程度回収し、洗浄液とした。ガラス温室の 4 か所、パイプハウスの 6 か所から洗浄液を回収し、フィルターで吸引ろ過した後、フィルターを WA 培地に置床した。培地上に形成された菌叢を滅菌爪楊枝でかきとり滅菌水中に入れ、その上清を PCR 法に用いた。PCR 法によって、陽性が確認された菌株が 1 つ以上あった箇所を陽性箇所とした

注 2) かん水飛沫液の調査は、ハスグチを用いて植物体頭上から 20 秒間散水を行い、発病圃場のベッド内及び通路に設置した 2 L ビーカーに貯留した水を検出に用いた。上記と同様に貯留水をフィルターで吸引ろ過し、PCR 法によって検出を行い、陽性が確認された菌株が 1 つ以上あった箇所を陽性箇所とした

#### [発表及び関連文献]

- 1 令和 6 年度試験研究成果発表会（花植木部門）
- 2 酒井ら、LAMP 法および PCR 法によるトルコギキョウ斑点病菌 *Pseudocercospora nepheloides* の検出技術の開発、日本植物病理学会報、第 88 巻第 3 号、2022 年
- 3 大川ら、トルコギキョウ斑点病菌の栽培環境からの検出手法の開発、日本植物病理学会報、第 90 巻第 3 号、2024 年

#### [その他]

- 1 令和 2 年度試験研究要望課題（提起機関：安房農業事務所）
- 2 緊急技術開発促進事業「南房総地域で発生するトルコギキョウ斑点病の初期防除を目指した発生生態の解明と診断法の確立」（令和 3 ～ 5 年度）